

DOCKET NO.: 217770US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Takashi SHIBATA et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/04285

INTERNATIONAL FILING DATE: June 28, 2000

FOR: GENE ENCODING CYCLIC LIPOPEPTIDE ACYLASE AND EXPRESSION OF THE SAME

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

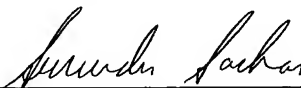
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	11-189644	02 July 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/04285. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

28.06.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 18 AUG 2000

WIPO PCT

107019282

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 7月 2日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第189644号

出願人

Applicant(s):

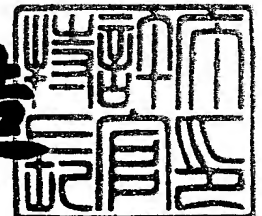
藤沢薬品工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3060405

【書類名】 特許願
 【整理番号】 A3998
 【提出日】 平成11年 7月 2日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12N 15/00
 C12N 15/52

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市中千種区松竹町 1 - 3 8 プリオール牧野
 3 B

【氏名】 柴田 孝

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県海部郡甚目寺町大字下萱津字五反田 3 1 - 1

【氏名】 野口 祐嗣

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市並木 3 - 1 1 - 1 1

【氏名】 山下 道雄

【特許出願人】

【識別番号】 000005245

【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715693

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子およびその発現

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)または(b)の全部または一部を含む、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA

(b)上記(a)の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA

【請求項 2】 以下の(a)または(b)の全部または一部を含む、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA

(b)配列表配列番号 1 で示される塩基配列において少なくとも(1) 6 0 %の同一性、(2) 7 0 %の同一性、(3) 8 0 %の同一性、(4) 9 0 %の同一性、または(5) 9 5 %の同一性を有する DNA

【請求項 3】 請求項 1 または 2 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 4】 請求項 1 または 2 記載の遺伝子を機能的に含む発現ベクター

【請求項 5】 請求項 3 または 4 記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項 6】 請求項 4 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リボペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リボペプチドアシラーゼの製造方法。

【請求項 7】 請求項 6 記載の製造方法によって製造される環状リボペプチドアシラーゼ。

【請求項 8】 以下の(a)または(b)の全部または一部を含む、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列からなる DNA

(b) 上記(a)のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

【請求項 9】 以下の(a)または(b)の全部または一部を含む、環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a) 配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列において少なくとも(1) 6 0 %の同一性、(2) 7 0 %の同一性、(3) 8 0 %の同一性、(4) 9 0 %の同一性、または(5) 9 5 %の同一性を有するDNA

【請求項 1 0】 請求項 8 または 9 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 1 1】 請求項 8 または 9 記載の遺伝子を機能的に含む発現ベクター。

【請求項 1 2】 請求項 1 0 または 1 1 記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項 1 3】 請求項 1 1 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リポペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リポペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リポペプチドアシラーゼの製造方法。

【請求項 1 4】 請求項 1 3 記載の製造方法によって製造される環状リポペプチドアシラーゼ。

【請求項 1 5】 配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列からなるDNAがコードする環状リポペプチドアシラーゼ。

【請求項 1 6】 配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列において少なくとも(1) 6 0 %の同一性、(2) 7 0 %の同一性、(3) 8 0 %の同一性、(4) 9 0 %の同一性、または(5) 9 5 %の同一性を有するDNAがコードする環状リポペプチドアシラーゼ。

【請求項 1 7】 請求項 4 または 1 1 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に環状リポペプチド物質を接触させる工程を含む、環状リポペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基

をアミノ基へと脱アシル化する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、環状リポペプチド物質のアシル側鎖を脱アシル化する酵素（以下環状リポペプチドアシラーゼともいう）、それをコードする遺伝子、該遺伝子を用いた遺伝子操作による環状リポペプチドアシラーゼの製造方法および環状リポペプチド物質のアシル側鎖を脱アシル化する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

環状リポペプチド物質、例えばFR901379物質およびその類似体のアシル側鎖を脱アシル化する酵素としては、ストレプトマイセス属に属する細菌（例えばStreptomyces anulatus No.4811株、Streptomyces anulatus No.8703株、Streptomyces sp. No.6907株）が生産する酵素が報告されている（WO97/32975号公報）。さらに、WO97/47738号公報には、Oidiodendron tenuissimum IF0 6798株、Oidiodendron echinulatum IF0 31963株、Oidiodendron truncatum IF0 9951株、Oidiodendron truncatum IF0 31812株、Oidiodendron sp. No.30084株、Verticillium sp. No.30085株が生産する酵素が報告されている。

当該酵素の大量生産、あるいは生産時間の短縮化が求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、環状リポペプチドアシラーゼをより効率良く採取することを目的とする。より具体的には本発明は、当該環状リポペプチドアシラーゼのアミノ酸配列の決定、それをコードする遺伝子の決定、ならびに該遺伝子を用いた遺伝子操作による当該酵素の製造方法および環状リポペプチド物質のアシル側鎖を脱アシル化する方法の提供を目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、環状リポペプチドアシラーゼのコード領域をクローニングすることに成功し本発明を完成した。さらに本発明者らは該DNAを含む発現ベクターを宿主細胞に導入し、当該環状リポペプチドアシラーゼ活性を発現させた。

【0005】

すなわち本発明は以下の通りである。

(1) 以下の(a)または(b)の全部または一部を含む、環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号1で示される塩基配列からなるDNA

(b)上記(a)のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

(2) 以下の(a)または(b)の全部または一部を含む、環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号1で示される塩基配列からなるDNA

(b)配列表配列番号1で示される塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNA

(3) 上記(1)または(2)記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(4) 上記(1)または(2)記載の遺伝子を機能的に含む発現ベクター。

(5) 上記(3)または(4)記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

(6) 上記(4)記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リポペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リポペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リポペプチドアシラーゼの製造方法。

(7) 上記(6)記載の製造方法によって製造される環状リポペプチドアシラーゼ。

(8) 以下の(a)または(b)の全部または一部を含む、環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～3359で示さ

れる塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a)のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

(9) 以下の(a)または(b)の全部または一部を含む、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a) 配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列からなるDNA

(b) 配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列において少なくとも(1) 6 0 %の同一性、(2) 7 0 %の同一性、(3) 8 0 %の同一性、(4) 9 0 %の同一性、または(5) 9 5 %の同一性を有するDNA

(1 0) 上記(8)または(9)記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(1 1) 上記(8)または(9)記載の遺伝子を機能的に含む発現ベクター。

(1 2) 上記(1 0)または(1 1)記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

(1 3) 上記(1 1)記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リボペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リボペプチドアシラーゼの製造方法。

(1 4) 上記(1 3)記載の製造方法によって製造される環状リボペプチドアシラーゼ。

(1 5) 配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列からなるDNAがコードする環状リボペプチドアシラーゼ。

(1 6) 配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列において少なくとも(1) 6 0 %の同一性、(2) 7 0 %の同一性、(3) 8 0 %の同一性、(4) 9 0 %の同一性、または(5) 9 5 %の同一性を有するDNAがコードする環状リボペプチドアシラーゼ。

(1 7) 上記(4)または(1 1)記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に環状リボペプチド物質を接触させる工程を含む、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する方法。

【 0 0 0 6 】

【発明の実施の態様】

本発明において、環状リポペプチドアシラーゼとは、例えば F R 9 0 1 3 7 9 物質及びその類似体、あるいはechinocandin Bのような類縁体のアシル側鎖を脱アシル化する酵素である。

【 0 0 0 7 】

本発明の環状リポペプチドアシラーゼは大小 2 つのサブユニットからなり、各サブユニットはそれぞれ以下の特徴を有する。

大サブユニット：

(1)分子量：約 6 1 k D a (S D S - P A G E)

(2)アミノ酸分析：

N末端アミノ酸配列が、Ser-Asn-Ala-Val-Ala-Phe-Asp-Gly-Ser-Thr-Thr-Val-Asn-Gly-Arg-Gly-Leu-Leu-Leu-Gly (配列表配列番号 2) または該アミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である。

(3)配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 6 6 5 ~ 3 3 5 9 で示される塩基配列からなる DNA または当該 DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA、若しくは当該塩基配列において少なくとも (1) 6 0 % の同一性、(2) 7 0 % の同一性、(3) 8 0 % の同一性、(4) 9 0 % の同一性、または (5) 9 5 % の同一性を有する DNA がコードする蛋白質。

【 0 0 0 8 】

小サブユニット：

(1)分子量：約 1 9 k D a (S D S - P A G E)

(2)アミノ酸分析：

N末端アミノ酸配列が、Gly-Ser-Gly-Leu-Ser-Ala-Val-Ile-Arg-Tyr-Thr-Glu-Tyr-Gly-Ile-Pro-His-His-Val-Ala (配列表配列番号 3) または該アミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である。

(3)配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1 0 6 5 ~ 1 6 6 4 で示さ

れる塩基配列からなるDNAまたは当該DNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA、若しくは当該塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNAがコードする蛋白質。

【0009】

本発明の環状リポペプチドアシラーゼは、上記の特徴を有する限りその由来に特に限定はなく、天然に存在する生物起源のもの他、自然もしくは人工の突然変異体、あるいは変種、すなわち外来の環状リポペプチドアシラーゼ遺伝子を導入して得られる形質転換体由来のものも全て包含される。

【0010】

人工的に突然変異体を作製する方法としては、例えば、部位特異的突然変異誘発が挙げられる。より具体的には当該方法を用いて配列表配列番号1に示される塩基配列に任意の変異をもたらすことにより、変異環状リポペプチドアシラーゼを得ることができる。かくして得られる変異環状リポペプチドアシラーゼは、上記特徴を具備している。

【0011】

本発明の環状リポペプチドアシラーゼは、(1)該酵素を産生する細胞または組織の培養物を原料として単離精製する方法、(2)化学的に合成する方法または(3)遺伝子組換え技術等により環状リポペプチドアシラーゼを発現するように操作された細胞から精製する方法等の公知手法を適宜用いることによって取得することができる。

【0012】

本発明の環状リポペプチドアシラーゼの単離精製は、例えば以下のようにして行うことができる。すなわち適当な液体培地中で、環状リポペプチドアシラーゼを発現している細胞を培養し、得られる培養物から公知の方法で抽出、精製される。当該抽出、精製の方法は目的生成物の存在する画分に応じて適宜公知の手法が用いられる。

【0013】

具体的には次のようにして行なわれる。まず、培養物をそのまま濾過又は遠心

分離等の常法に付して細胞又は上清を回収する。細胞中に該酵素が蓄積されている場合には、当該回収した細胞を適当な緩衝液剤中に懸濁して、さらに界面活性剤を適当な濃度で加えて膜を可溶化する。宿主細胞が細胞壁を有する場合、リゾチームや超音波による前処理が必要である。界面活性剤としてはドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) 等が挙げられるが、これらは強力なタンパク質変性作用を有するので、タンパク質が生物活性を持つように折り畳まれるためには、例えば Triton X-100 等の穏やかな非イオン性界面活性剤を用いることが好ましい。次いで得られる粗抽出液を、必要ならば界面活性剤の存在下で、一般に用いられる方法を適宜組み合わせることによって該酵素を単離精製する。

【0014】

該酵素が培養培地中に存在する場合には、まず培養物を濾過又は遠心分離に付して沈澱物（細胞等の固形物）を除去することにより、溶液部分のみを得、それを一般に用いられる方法を適宜組み合わせることによって目的物質を単離精製する。塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。より具体的には、例えば、減圧濃縮、凍結乾燥、常用の溶媒による抽出、pH調整、陰イオン交換樹脂または陽イオン交換樹脂、非イオン性吸着樹脂等の常用の吸着剤による処理、結晶化、再結晶化等の慣用の方法によって分離、精製することができる。

【0015】

化学合成による本発明の環状リポペプチドアシラーゼの製造は、例えば配列表配列番号1に示される塩基配列を基にして、該配列の全部または一部がコードするアミノ酸を特定し、該アミノ酸をペプチド合成機を用いて合成あるいは半合成することにより行なうことができる。

【0016】

環状リポペプチドアシラーゼ遺伝子のクローニングは、通常以下の方法により行なわれる。まず、環状リポペプチドアシラーゼを産生する細胞または組織より、通常の方法に従って該酵素を完全または部分精製し、大サブユニットおよび小サブユニットそれぞれのN末端アミノ酸配列をエドマン法により決定する。また、各サブユニットを配列特異的プロテアーゼで部分分解して得られるオリゴペプチドのアミノ酸配列を同様にエドマン法により決定する。決定された部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーまたはプローブとして用いて、環状リポペプチドアシラーゼを産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー（もしくはブランク）ハイブリダイゼーション法によって各サブユニットをクローニングする。

得られた各サブユニットの塩基配列をもとにしてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、再度環状リポペプチドアシラーゼを産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー（もしくはブランク）ハイブリダイゼーション法を繰り返して環状リポペプチドアシラーゼをクローニングする。

【0017】

あるいは、完全または部分精製された環状リポペプチドアシラーゼの全部または一部を抗原として該酵素またはそのサブユニットに対する抗体を常法に従って作製し、環状リポペプチドアシラーゼを産生する細胞または組織より調製されたcDNAまたはゲノミックDNAライブラリーから、抗体スクリーニングにより該酵素および／または該酵素のサブユニットをコードするDNAをクローニングすることもできる。

【0018】

さらに、上述の方法とは別に、本発明の環状リポペプチドアシラーゼをコードするDNAは、PCR法を用いて直接クローニングすることもできる。すなわち、該酵素活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA（もしくはmRNA）を鋳型とし、増幅断片が環状リポペプチドアシラーゼのコード領域、大サブユニットのコード領域、もしくは小サブユニットのコード領域を

カバーするような適当なオリゴヌクレオチドの対をプライマーとして用いて、常法に従ってPCRを行なうことにより当該酵素のコード領域、大サブユニットのコード領域もしくは小サブユニットのコード領域を含むDNA断片を増幅することができる。

【0019】

得られたDNAインサートの塩基配列は、マルサム・ギルバート法やジデオキシターミネーション法等の公知のシークエンス技術を用いて決定することができる。

【0020】

本発明の環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子は、配列表配列番号1に示される塩基配列から実質的になるDNAの、全部または一部を含むものである。ここで「実質的になるDNA」とは、上記特定の塩基配列からなるDNAに加えて、ストリンジェントな条件（本発明では、塩基配列において約60%以上の相同性を有するDNAがハイブリダイズし得る条件をいい、ストリンジェンシーはハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができる）において、上記の特定塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし得る塩基配列からなるDNA、若しくは配列表配列番号1で示される塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNAを意味する。当該遺伝子がコードする環状リポペプチドアシラーゼは、例えばFR901379物質及びその類似体、あるいはechinocandin Bのような類縁体のアシル側鎖を脱アシル化することができ、且つ各サブユニットは上述の理化学的性質を有する。

【0021】

本発明の環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子の別の態様は、配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～3359で示される塩基配列から実質的になるDNAの、全部または一部を含むものである。ここで「実質的になるDNA」とは上述のとおりである。

【0022】

本発明の遺伝子はいかなる方法で得られるものであってもよい。例えば、mRNAから調製される相補DNA（cDNA）、ゲノミックライブラリーから調製されるゲノミックDNA、化学的に合成されるDNA、RNA又はDNAを鋳型としてPCR法により増幅させて得られるDNA及びこれらの方法を適当に組み合わせるDNA等が含まれる。

【0023】

本発明はまた、上記のいずれかの遺伝子を含む組換えベクターに関する。本発明の組み換えベクターは、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター等が包含される。当該組換えベクターは、簡便には当分野において入手可能なクローニングベクターまたは発現ベクターに上記のいずれかのDNAを適当な制限酵素部位を利用して挿入することによって調製することができる。

【0024】

特に、本発明の組換えベクターは環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子を機能的に含む発現ベクターである。ここで「機能的に」とは、そのベクターに適合する宿主細胞内で該遺伝子（DNA）が転写され、それにコードされる蛋白質が産生され得るように該遺伝子が配置されていることを意味する。好ましくは、プロモーター領域、開始コドン、環状リポペプチドアシラーゼまたはその各サブユニットをコードする遺伝子、終止コドンおよびターミネーター領域が連続的に配列された発現カセットを有するベクターである。用いられる発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種宿主細胞内で機能して、その下流に配置された遺伝子を発現させ得るプロモーター領域と、該遺伝子の転写を終結させるシグナル、すなわちターミネーター領域を含有し、該プロモーター領域と該ターミネーター領域とが少なくとも1つのユニークな制限酵素認識部位を含む配列を介して連結されたものであれば特に制限はないが、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子をさらに含有していることが好ましい。さらに所望により、該発現ベクターは開始コドンおよび終止コドンを、それぞれプロモーター領域の下流およびターミネーター領域の上流に含んでいてもよい。

【 0 0 2 5 】

環状リボペプチドアシラーゼの大サブユニット（あるいは小サブユニット）をコードする遺伝子を含む発現ベクターを環状リボペプチドアシラーゼの製造の為に使用する場合には、当該DNAに加えて、小サブユニット（あるいは大サブユニット）をコードするDNAを宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターを用いる。大サブユニットをコードするDNA、小サブユニットをコードするDNAはそれぞれ別のプロモーターの制御下に置かれていても良く、あるいは同一のプロモーターの制御下にタンデムに配置されていてもよい。

【 0 0 2 6 】

取得を目的として環状リボペプチドアシラーゼを培地中へ分泌させるためには本発明の発現ベクターはシグナル配列を機能的に含有していることが好ましい。当該シグナル配列は宿主細胞の蛋白質の分泌機構が認識できるものであれば特に限定されないが、宿主細胞が放線菌の場合、本発明の環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子とその由来を同じくするストレプトマイセス属のものが好ましい。該シグナル配列は細胞内のプロテアーゼにより切断除去されて成熟蛋白質が細胞外に分泌される。

【 0 0 2 7 】

宿主細胞として細菌を用いる場合、一般に発現ベクターは上記のプロモーター領域およびターミネーター領域に加えて宿主細胞内で自律複製し得る複製可能単位を含む必要がある。プロモーター領域には、プロモーター、オペレーターおよびShine-Dalgarno (SD) 配列が含まれる。例えば、宿主が大腸菌の場合には、プロモーター領域としてTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーター等が、また、宿主が枯草菌の場合には、プロモーター領域としてSPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等が、宿主が放線菌の場合には、melC、tipA、ermE、aphI等が挙げられる。ターミネーター領域としては、通常使用されている天然または合成のターミネーターを用いることができる。また、選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、チオストレプトン等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。開

始コドンとしては通常 A T G が用いられるが、場合によって G T G を使用することもできる。終止コドンとしては常用の T G A、T A A および T A G が用いられる。

【0028】

本発明の環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子が該酵素を産生する細胞または組織由来のゲノミック DNA から調製され、本来のプロモーターおよびターミネーター領域を含有する形態で得られる場合には、本発明の発現ベクターは、形質転換しようとする宿主細胞内で複製保持または自律増殖できる公知のクローニングベクターの適当な部位に該 DNA を挿入することによって調製することができる。用いられるクローニングベクターとしては、宿主が細菌の場合、大腸菌由来の p B R 系ベクター、p U C 系ベクター等、あるいは枯草菌由来の p U B 110、p T P 5、p C 194 等、あるいは放線菌由来の p I J 702、p S K 1、p S K 2、S C P 2、S C P 1. 2、p G A 482、p M C X p r e s s 等が例示される。

【0029】

本発明の形質転換体は、本発明の環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子を含有する組換えベクターで宿主細胞を形質転換することにより調製することができる。宿主細胞は使用する組換えベクターに適合し、形質転換され得るのであれば特に限定されず、当分野で通常使用される天然に存在する細胞あるいは人工的に作製された変異体細胞もしくは組換え体細胞など種々の細胞が利用できる。好ましくは細菌、特に大腸菌、枯草菌、および放線菌等であり、より好ましくは放線菌の一種であるストレプトマイセス属細菌である。

【0030】

組換えベクターの宿主細胞への導入は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、宿主が大腸菌や枯草菌等の細菌の場合には、Cohen らの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972)]、プロトプラスト法 [Mol. Gen. Genet., 168: 111 (1979)] およびコンピテント法 [J. Mol. Biol., 56: 209 (1971)] 等が挙げられる。

宿主が放線菌、特にストレプトマイセス属細菌の場合は、transformation Gen

etic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985.に記載されている方法(PEG-assisted protoplast transformation)等が挙げられる。

【 0 0 3 1 】

本発明の環状リボペプチドアシラーゼは、上記の環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子を機能的に含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物から当該酵素を採取することにより製造することができる。単離精製については環状リボペプチドアシラーゼ活性の存在する画分に応じて、上述の如く、通常使用される種々の分離技術を適宜組み合わせることにより行なうことができる。

【 0 0 3 2 】

用いられる栄養培地としては、炭素源としてグルコース、キシロース、ガラクトース、グリセリン、スターチ、デキストリン等のような炭水化物が挙げられ、他の炭素源としてはマルトース、ラムノース、ラフィノース、アラビノース、マンノース、サリシン、コハク酸ナトリウム、フルクトース、マンニトール、グルシトール、ラクトース、ソルボース、シュクロース等が挙げられる。

好ましい窒素源としては、無機もしくは有機窒素源（例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトトリプトン、ビーフ抽出物、大豆粉、小麦胚芽、ポテトプロテイン、米ぬか、ピーナッツパウダー、グルテン、コーン抽出物等）を含んでいてもよい。さらに所望により、他の栄養源〔例えば、無機塩（例えば、ニリン酸ナトリウムまたはニリン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム）、ビタミン類（例えば、ビタミンB1）、抗生物質（例えば、アンピシリン、カナマイシン、チオストレプトン）等〕を培地中に添加してもよい。

特に培養培地が著しく発泡する場合には、必要に応じて液状パラフィン、脂肪油、植物油、シリコーン等の消泡剤を添加してもよい。

【 0 0 3 3 】

形質転換体の培養は、通常 pH 4 ～ 9、好適には 6 ～ 7、15 ～ 35℃、好適

には25～35℃で10～144時間で行われる。

【0034】

本発明の環状リポペプチド物質の側鎖のアシル基を脱アシル化する方法は、上記の環状リポペプチドアシラーゼをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物をそのまま用いて環状リポペプチド物質を接触させることにより、該物質の側鎖のアシル基をアミノ基へと脱アシル化させる。あるいは当該酵素活性が該形質転換体の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液に環状リポペプチド物質を接触させることにより、該物質の側鎖のアシル基をアミノ基へと脱アシル化させる。

【0035】

菌体抽出液に環状リポペプチド物質を接触させる場合には、培養終了後の培養物を遠心分離または濾過して菌体を回収し、これを適当な緩衝液、例えば酢酸緩衝液中に懸濁して、超音波処理等により菌体を破碎した後遠心処理して得られる上清を菌体抽出液として使用すればよい。

【0036】

また、環状リポペプチドアシラーゼを生産する宿主細胞を当該環状リポペプチド物質存在下で培養することによっても、脱アシル化した環状リポペプチド物質を得ることができる。

【0037】

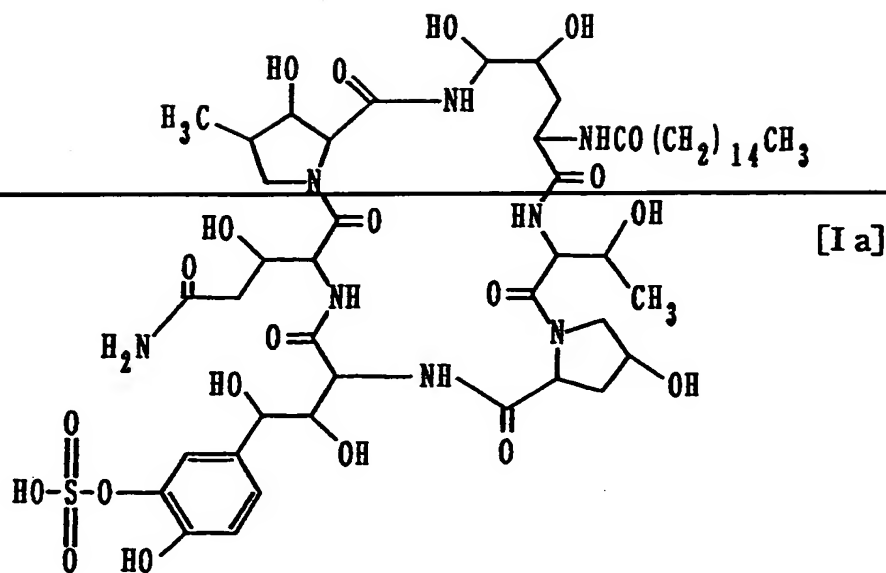
本発明の環状リポペプチドアシラーゼの基質となる環状リポペプチド物質とは、ポリペプチド環を有し、該環上に側鎖として「アシルアミノ基」を有する物質をいい、この物質はさらに他の側鎖を有していてもよい。例えばWO97/32975号公報に記載されたものが挙げられる。

【0038】

該「環状リポペプチド物質」の一例であるFR901379物質は微生物*Coleophoma* sp. F-11899株(FERM BP-2635)によって生産される抗真菌活性を持った既知物質(特開平3-184921号公報)であり、下記構造式[Ia]で示される化合物である。

【0039】

【化1】

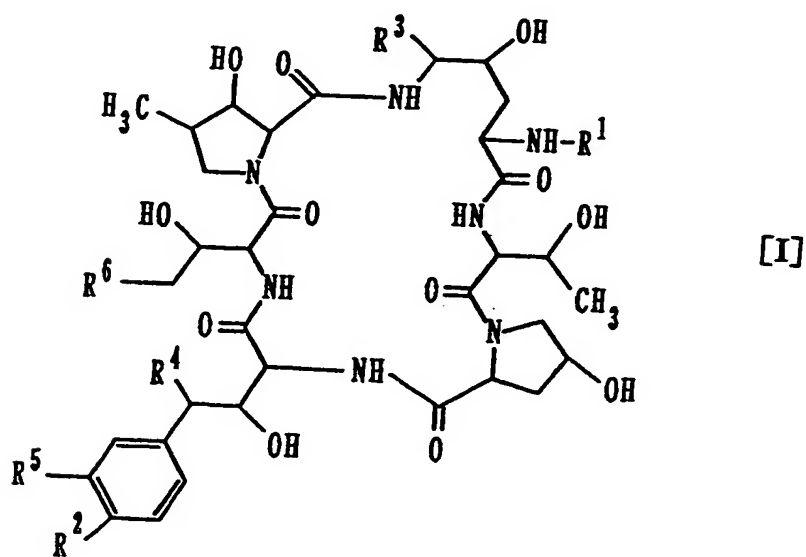


【0040】

また、FR901379物質類似体とは、下記一般式【I】で示される化合物またはその塩をいう。

【0041】

【化2】



【0042】

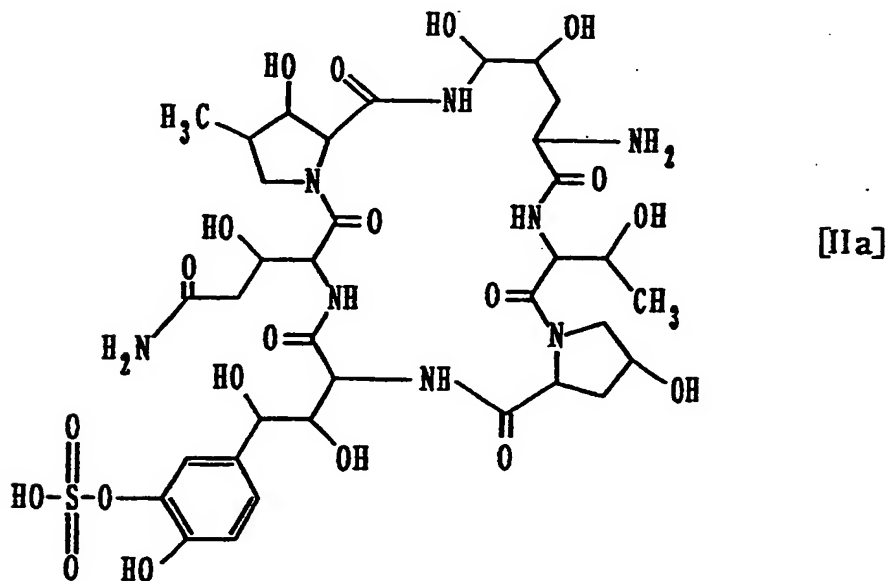
[式中 R^1 はアシル基、 R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、 R^3 は水素またはヒドロキシ基、 R^4 は水素またはヒドロキシ基、 R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および R^6 は水素またはカルバモイル基を意味する]

【0043】

本発明の環状リポペプチドアシラーゼは、環状リポペプチド物質の側鎖の「アシルアミノ基」を脱アシル化して、「アミノ基」へと導くものであり、具体的にはFR901379物質またはその塩のパルミトイル側鎖あるいはFR901379物質を含む前記一般式[I]で示されるアシラーゼFR901379物質類似体またはその塩のアシル側鎖を脱アシル化して環状リポペプチド物質、具体的には、下記構造式[IIa]で示される化合物(FR179642物質)またはその塩

【0044】

【化3】

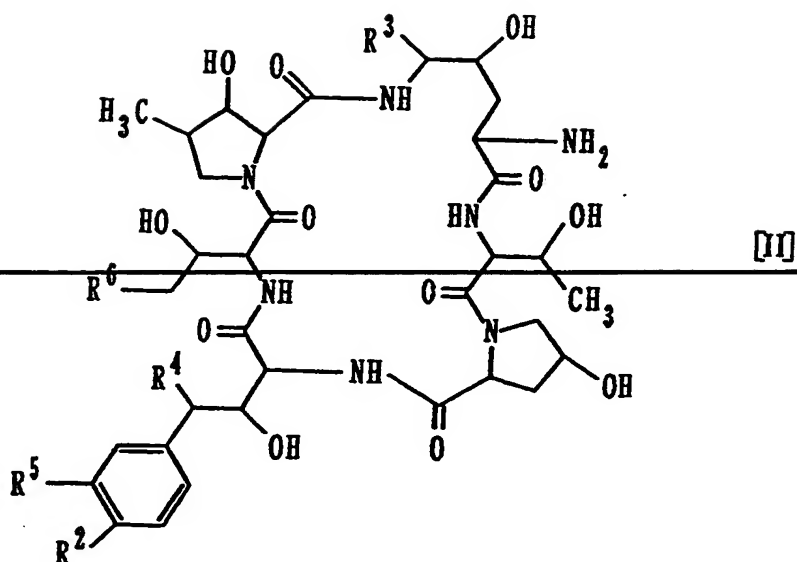


【0045】

あるいはFR179642物質を含む下記一般式[II]で示されるFR179642類似体またはその塩

【0046】

【化 4】



【0047】

【式中、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 および R^6 は前記と同じ基を意味する】を生産させるアシラーゼである。

【0048】

化合物【I】および【II】の好適な塩は慣用の無毒性のモノまたはジ塩であって、金属塩、例えばアルカリ金属塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等）、アンモニウム塩、有機塩基との塩（例えば、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N，N′-ジベンジルエチレンジアミン塩等）等、有機酸付加塩（例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等）、無機酸付加塩（例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等）、アミノ酸（例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等）との塩等が挙げられる。

【0049】

脱アシル化反応終了後、脱アシル化された環状リポペプチド物質、具体的には一般式【II】で示されるFR179642類似体（FR179642物質を含む

）の反応液からの分離・精製は、従来公知の分離・精製法、例えば減圧濃縮、凍結乾燥、抽出、pH調整、吸着樹脂、イオン交換樹脂、晶析、再結晶等の方法を適宜組み合わせることができる。

【0050】

【実施例】

以下に本発明を具体的に説明するため実施例を示すが、本発明はこれら実施例によって何ら制限されるものではない。

なお、本発明において使用する多くの技法、反応及び分析方法は当業者らに自體周知のものである。又、酵素、プラスミド、宿主等は特に記載のない場合は商業的に入手可能なものである。

【0051】

実施例1 Streptomyces sp. TA6907株が生産する環状リポペプチドアシラーゼ (FR901379アシラーゼ) のクローニング

(1) Streptomyces sp. TA6907株の染色体DNAの調製

Streptomyces sp. TA6907株 (FERM BP-5809; WO97/32975号公報) の凍結保存液の1白金耳を0.3%酵母エキス、0.5%ペプトン、0.3%麦芽エキス、1%グルコース、5%ショ糖、5mM MgCl₂、0.5%グリシンからなる培地 (pH6.5) で30℃、48時間培養した。培養液10mlを遠心 (5,000rpm、10分間) により集菌した後、QIAGEN Genomic tip 20/G (キアゲン社) を用い、プロトコールに従って処理することで、染色体DNAを調製した。

【0052】

(2) 小サブユニットの解析

①小サブユニットの既知アミノ末端アミノ酸配列からのPCR用プライマーの設計

FR901379アシラーゼの小サブユニットのアミノ末端アミノ酸配列
Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro His His
Val Ala (配列表配列番号3) (WO97/32975号公報)
から以下のフォワードプライマー (SF3) とリバースプライマー (SR2) を設計し

た。

SF3 -CTS TCS GCS GTS ATC (配列表配列番号4)

SR2 -GTG GTG SGG GAT SCC (配列表配列番号5)

S:CまたはGを表す。

②小サブユニットの既知アミノ末端アミノ酸配列から設計したプライマーを用いてのPCR

上記(1)で調製したStreptomyces sp. TA6907株の染色体DNA 100 ng および上記①で設計した各プライマー 1 nmol を用いて、GeneAmp PCR System Model 2400 (パーキンエルマー社) を使用してPCRを行なった。反応混液 50 μ l [PCR緩衝液中、0.2 mM各dNTPs およびKOD Dash (東洋紡社) 1.5 ユニット] を、98℃での変性20秒間、60℃でのアニーリング2秒間、および74℃でのポリメリゼーション10秒間からなるPCRに30回供した。増幅後、小サブユニットの既知アミノ末端の一部をコードする断片(45 bp) を5%アガロースゲル電気泳動によって単離した。

③PCR断片のクローニング

上記②で単離したPCR増幅断片(45 bp) をpCR-Script Amp Cloning Kit (ストラタジーン社) を用い、プロトコールに従って処理することで、pCR-Script Amp SK(+)に該断片を挿入したプラスミドp3S4を得た。

④塩基配列分析

上記③で得られたプラスミドp3S4の塩基配列分析を310 DNAシーケンサー (パーキンエルマー社) にて、M13シーケンシングプライマーであるリバースプライマー (New England Biolabs社) を用いて、ダイデオキシターミネーション法により、添付のプロトコールに従ってシーケンシングを行った。結果を図1に示す。

【0053】

(3) 大サブユニットの解析

①大サブユニットの既知アミノ末端アミノ酸配列からのPCR用プライマーの設計

FR901379 アシラーゼの大サブユニットのアミノ末端アミノ酸配列

Ser Asn Ala Val Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly Leu Leu
Leu Gly (配列表配列番号 2) (W O 9 7 / 3 2 9 7 5 号公報)
から以下のフォワードプライマー (LF2) とリバースプライマー (LR) を設計した。

LF2 - CS GTS GCS TTC GAC GG (配列表配列番号 6)

LR - SCC SAG SAG SAG SCC (配列表配列番号 7)

S:CまたはGを表す。

②大サブユニットの既知アミノ末端アミノ酸配列から設計したプライマーを用いてのPCR

上記(1)で調製したStreptomyces sp. TA6907株の染色体DNA 100 ng および上記(3)の①で設計した各プライマー 1 nmol を用いて、GeneAmp PCR System Model 2400 (パーキンエルマー社) を使用してPCRを行なった。反応混液 50 μ L [PCR緩衝液中、0.2 mM各dNTPs およびKOD Dash (東洋紡社) 1.5 ユニット] を、98℃での変性20秒間、65℃でのアニーリング2秒間、および74℃でのポリメリゼーション10秒間からなるPCRに30回供した。増幅後、大サブユニットの既知アミノ末端の一部をコードする断片(53 bp) を5%アガロースゲル電気泳動によって単離した。

③PCR断片のクローニング

上記(3)の②で単離したPCR増幅断片(53 bp) をpCR-Script Amp Cloning Kit (ストラタジーン社) を用い、プロトコールに従って処理することで、pCR-Script Amp SK(+)に該断片を挿入したプラスミドp3L1を得た。

④塩基配列分析

プラスミドp3L1の塩基配列分析を310 DNAシーケンサー (パーキンエルマー社) にて、M13シーケンシングプライマーであるリバースプライマー (New England Biolabs社) を用いて、ダイデオキシターミネーション法により、添付のプロトコールに従ってシーケンシングを行った。結果を図2に示す。

【0054】

(4) FR901379アシラーゼの解析

①小、大サブユニット間でのPCRのためのプライマーの設計

今まで知られているアシラーゼでは、そのほとんどが小サブユニット、大サブユニットの順に並んでコードされている。そこで小サブユニットの既知アミノ酸配列内でのPCRから決定した塩基配列をもとに、フォワードプライマー20Sを設計した。同様に、大サブユニットの既知アミノ酸配列内でのPCRから決定した塩基配列をもとに、リバースプライマー19Lを設計した。

20S -ATC CGG TAC ACG GAG TAC GG (配列表配列番号8)

19L -C GTT CAC CGT CGT GGA GCC (配列表配列番号9)

②小、大サブユニット間でのPCR

上記(1)で調製した*Streptomyces* sp. TA6907株の染色体DNA 100 ng および上記(4)の①で設計した各プライマー 20 pmol を用いて、GeneAmp PCR System Model 2400 (パーキンエルマー社)を使用してPCRを行なった。反応混液 50 μ l [PCR緩衝液中、0.2 mM各dNTPs およびKOD Dash (東洋紡社) 2.5 ユニット] を、98℃での変性20秒間、70℃でのアニーリング2秒間、および74℃でのポリメリゼーション20秒間からなるPCRに30回供した。増幅後、該アシラーゼの一部をコードする断片(約600 bp)を2%アガロースゲル電気泳動によって単離した。

③PCR断片のクローニング

上記(4)の②で単離したPCR増幅断片(約600 bp)をpCR-Script Amp Cloning Kit (ストラタジーン社)を用い、プロトコールに従って処理することで、pCR-Script Amp SK(+)に該断片を挿入したプラスミドpSL1を得た。

④塩基配列分析

上記(4)の③で得られたプラスミドpSL1の塩基配列分析を310 DNAシーケンサー (パーキンエルマー社)にて、M13シーケンシングプライマーであるフォワードプライマーおよびリバースプライマー (New England Biolabs社)を用いて、ダイデオキシターミネーション法により、添付のプロトコールに従ってシーケンシングを行った。その結果、該アシラーゼと思われる遺伝子の一部を取得できた。

【0055】

(5) 染色体DNAライブラリーの調製

上記(1)で調製したStreptomyces sp. TA6907株の染色体DNA 1 μ gをSau 3A I(100 mU)で37℃、10分間処理することで、部分消化した。また、コスミドpCos6EMBL (Gene, 57, 229-237 (1987)参照) 1 μ gをBamH I 5Uで37℃、1時間処理した。両処理液をエタノール沈殿後、2倍希釈TE (5 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5 mM) 5 μ lで溶解後、10x T4 DNA ligase buffer (660 mM Tris-HCl (pH7.6), 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mM ATP) 0.7 μ lとT4 DNA ligase 0.7 μ lを加え、22℃、3時間保温した。このライゲーション液3 μ lをGAPACK III XL Packaging Extract (ストラタジーン社)を用い、プロトコールに従いインビトロ・パッケージングした。このパッケージング液を指示菌E. coli XL-1 Blue MRAに接触させることで、コスミドライブラリーを構築した。

【0056】

(6) コロニー直接PCRによるスクリーニング

上で得られた480個のコスミドクローンを、プライマー20Sおよび19L各20 pmolを用いて、GeneAmp PCR System Model 2400 (パーキンエルマー社)を使用してコロニー直接PCRを行なった。反応混液20 μ l [PCR緩衝液中、0.2 mM各dNTPsおよびKOD Dash (東洋紡社) 2.5ユニット]を、98℃での変性20秒間、68℃でのアニーリング2秒間、および74℃でのポリメリゼーション20秒間からなるPCRに30回供したところ、約600bpの断片が特異的に増幅したコスミドクローンNo. 133を得た。

【0057】

(7) コスミドクローンNo. 133のサブクローニング

コスミドクローンNo. 133をEcoR IとPst Iで消化し、得られた約8kbの断片をpUC18のEcoR I/Pst Iサイトに挿入することで、プラスミドpEP1を得た。さらに、プラスミドpEP1をEcoR IとBamH Iで消化し、得られた約5.5kbの断片をpUC18のEcoR I/BamH Iサイトに挿入することで、プラスミドpEBを得た。

【0058】

(8) 塩基配列分析

プラスミドpEBの塩基配列分析を310 DNAシーケンサー (パーキンエルマー社)にて、M13シーケンシングプライマーであるフォワードプライマー、リバ

ースプライマー (New England Biolabs社) および表 1 に記載する合成オリゴヌクレオチドを用いて、ダイデオキシターミネーション法により、添付のプロトコールに従ってシーケンシングを行った。

【 0 0 5 9 】

【表 1】

AC1	CAA CTG CGC GTA GTC C	(配列表配列番号 11)
AC2	CAT GGG TTC CAA CGC G	(配列表配列番号 12)
AC3	GCT GTC AAC CGT CTG G	(配列表配列番号 13)
AC4	ACG CGC TGA ACG ATC C	(配列表配列番号 14)
AC5	CGG ACC TGG ACC TAC C	(配列表配列番号 15)
AC6	GTG GGT GAA CAC GAT CG	(配列表配列番号 16)
AC7	GAC CTT CAG CGG CAG C	(配列表配列番号 17)
AC8	CAA GTG GTG TGC GGC G	(配列表配列番号 18)
AC9	GTC GCT GGG CAT CTG G	(配列表配列番号 19)
AC10	GCT GCT GAC GTA CTC C	(配列表配列番号 20)
AC11	GTC AAC CGC ATG GTC C	(配列表配列番号 21)
AC12	ATC GCC TGG ATC GTC G	(配列表配列番号 22)
AC13	CGT CAG CGC GAT CAC C	(配列表配列番号 23)
AC14	GGT GTA CAG CAG CTG C	(配列表配列番号 24)
AC15	CTC CCT CGT CCT GAC C	(配列表配列番号 25)
AC16	GAG TTG TGC GCG TAG G	(配列表配列番号 26)
AC17	TGA CGC TTG GCC GTC C	(配列表配列番号 27)
AC18	GAC TAC GCG CAG TTG G	(配列表配列番号 28)
AC19	TAC AAC GCG TGG ATC G	(配列表配列番号 29)
AC20	GGT GAT CCG GTT CTG C	(配列表配列番号 30)
AC21	GGG TAG TGC GGG TTG C	(配列表配列番号 31)
AC22	CTG CAT CAG CTC AGC C	(配列表配列番号 32)
AC23	GTC CAC CAC TGG GTG C	(配列表配列番号 33)
AC24	GAA GCG GGG TAG GTG G	(配列表配列番号 34)
AC25	CCG GTG CTG AAG AAC C	(配列表配列番号 35)
AC26	CTG CCG CTG AAG GTC C	(配列表配列番号 36)
AC27	TCG AAC GGC GTC CTC C	(配列表配列番号 37)
AC28	TGG AGG ACG CCG TTC G	(配列表配列番号 38)
AC29	GCC TGG ATG TAG CTG G	(配列表配列番号 39)
AC30	GGA CAT CGC GCG TTC G	(配列表配列番号 40)
AC31	CGA ACG CGC GAT GTC C	(配列表配列番号 41)
AC32	CCG TGA CCA TGC GTG C	(配列表配列番号 42)
AC33	GCA CGC ATG GTC ACG G	(配列表配列番号 43)
AC34	GAG GAG ACC TAC CTC G	(配列表配列番号 44)
AC35	AGG TCC CGC TAC GAC G	(配列表配列番号 45)
AC36	GAC CAT GCG GTT GAC G	(配列表配列番号 46)
AC37	CAG TTC CGC CTC GTC G	(配列表配列番号 47)
AC38	CAG GTG GAC GTT GTC G	(配列表配列番号 48)
AC39	GTC GCT GAC GAT CAC G	(配列表配列番号 49)
AC40	GTG ATC GTC AGC GAC C	(配列表配列番号 50)
AC41	GGC GGT GAT GAA GTC G	(配列表配列番号 51)
AC42	CGA CTT CAT CAC CGC C	(配列表配列番号 52)
AC43	GGC GAC TTC TTC ACC G	(配列表配列番号 53)
AC44	CGG TGA AGA AGT CGC C	(配列表配列番号 54)
AC45	CCA GAC GGT TGA CAG C	(配列表配列番号 55)

【0 0 6 0】

塩基配列の解析により、ORFが見いだされ、その中に小サブユニットおよび大サブユニットのアミノ末端アミノ酸配列に対応するDNA配列がすべて含まれていた。このアシラーゼ遺伝子を含むプラスミドpEBの塩基配列を配列表配列番号1に示す。

【0061】

実施例2 環状リポペプチドアシラーゼの宿主細胞での発現

(1) ストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SBの構築

プラスミドpEBのEcoR IサイトをSac Iサイトに変換したプラスミドpSBを構築することにした。まず、合成オリゴマー (AAT TGA GCT C; 配列表配列番号10) 100 pmolを30 UのT4 polynucleotide kinaseで37℃、1時間処理することで、5'-OH末端をリン酸化した。そして、その反応液を70℃、10分間加熱し、T4 polynucleotide kinaseを失活させた。一方、1 μgのプラスミドpEBを5 UのEcoR Iで処理した後、1 UのBacterial Alkaline Phosphatase (BAP)で37℃、1時間処理することで、5'末端を脱リン酸化した。この2つの処理液をLigation High (東洋紡社) でライゲーションすることで、プラスミドpSBを構築した。

5 μgのプラスミドpSBを20 UのSac Iと20 UのBamH Iで処理することで、アシラーゼ遺伝子を含む5.7 kbのSac I-BamH I断片を得た。また、放線菌用ベクターであるpIJ702 (2 μg) (ATCC 35287) を10 UのSac Iと10 UのBgl IIで処理し、先に調製したアシラーゼ遺伝子を含む5.7 kbのSac I-BamH I断片とLigation High (東洋紡社) 存在下ライゲーションした。そのライゲーション液をGenetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985.に記載されている方法に従って、ストレプトマイセス・リビダンス 1326株 (J. General Microbiology 1983, 129, 2703-2713) を形質転換した。得られた形質転換株のうち1株をストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SBとした。

【0062】

(2) 形質転換株の培養およびFR901379アシラーゼの発現

5%ショ糖、1%グルコース、0.3%酵母エキス (Difco社)、0.5%バ

クトペプトン (Difco社)、0.3%肉エキス (Difco社)、5 mM MgCl_2 、0.5%グリシン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のチオストレプトン (pH 6.5) からなる培地 10 ml を 100 ml 容三角フラスコに入れ、形質転換株ストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SBの 5 mm 角の菌体を植菌した。 30°C 、3日間 (260 rpm) 培養し、その培養液のFR901379アシラーゼ活性を測定したところ、培養液 1 ml 当たり1時間に 30 mg のFR179642 (脱アシル化したFR901379物質) を生成する活性が得られた。

【0063】

当該アシラーゼ活性は以下のようにして測定した。

＜アシラーゼ活性の測定＞

$100 \text{ mg}/\text{ml}$ FR901379 (WO97/32975号公報参照) 水溶液 0.1 ml 、リン酸緩衝液 (pH 6.0) 0.1 ml 、メタノール 0.1 ml 、蒸留水 0.6 ml からなる溶液に、培養液 0.1 ml を加え、 37°C (125 rpm) で反応させる。15分後、4%酢酸 1 ml と蒸留水 2 ml を添加することで、反応を終了させる。そして、生成したFR179642 (脱アシル化したFR901379物質) を高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて、以下の条件で定量する。

カラム; Kaseisorb LC P0 Super ($4.6 \text{ mm I.D.} \times 250 \text{ mm}$) (東京化成)

カラム温度; 50°C

溶離液; 蒸留水: メタノール: リン酸 = 960:40:1

流速; $1 \text{ ml}/\text{min}$

検出; UV-215 nm

【0064】

【発明の効果】

本発明の、環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子を導入して得られた形質転換体から得られる組換え環状リポペプチドアシラーゼは、従来の *Streptomyces* Sp.No.6907株や *Streptomyces anulatus* No.8703株等の環状リポペプチドアシラーゼを生産する天然分離株を培養して得られるアシラーゼと同等の活性を有し、且つ当該形質転換体を使用することにより、その培養にかかる時間 (すな

わち環状リポペプチドアシラーゼの生産にかかる時間)を短縮することが可能となった。

【0065】

【配列表フリーテキスト】

配列番号4: FR901379 アシラーゼ小サブユニットのN末端アミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのフォワードプライマーとして作用すべく

設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号5: FR901379 アシラーゼ小サブユニットのN末端アミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのリバースプライマーとして作用すべく設

計されたオリゴヌクレオチド

配列番号6: FR901379 アシラーゼ大サブユニットのN末端アミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのフォワードプライマーとして作用すべく

設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号7: FR901379 アシラーゼ大サブユニットのN末端アミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのリバースプライマーとして作用すべく設

計されたオリゴヌクレオチド

配列番号8: FR901379 アシラーゼの小サブユニットおよび大サブユニットの間のアミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのフォワードプライ

マーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号9: FR901379 アシラーゼの小サブユニットおよび大サブユニットの間のアミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのリバースプライマ

ーマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号10: 制限部位をEcoR IサイトからSac Iサイトに変換する為に使用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号11: シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号12: シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号13: シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 1 4 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 1 5 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 1 6 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 1 7 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 1 8 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 1 9 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 0 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 1 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 2 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 3 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 4 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 5 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 6 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 7 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 2 8 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 2 9 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 0 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 1 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 2 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 3 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 4 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 5 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 6 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 7 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 8 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 3 9 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 4 0 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 4 1 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 4 2 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 4 3 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 4 4 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 4 5 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 4 6 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 4 7 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 4 8 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 4 9 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 5 0 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 5 1 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 5 2 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 5 3 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 5 4 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 5 5 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

【 0 0 6 6 】

【配列表】

SPECIMEN SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.
 <120> A GENE CODING A CYCLIC LOPOPEPTIDE ACYLASE AND
 AN EXPRESSION THEREOF
 <130> A3998
 <160> 55

<210> 1
 <211> 5692
 <212> DNA
 <213> Streptomyces Sp.
 <220>
 <221> CDS
 <222> (948)..(3362)
 <400> 1

```

gaattccgga tggttggaga ggccgatcca gacggtgggc ggggcgaaga ggctgtcggc   60
caggccccgt tcgacgaggt cgaagatcga ggcggcgctc ggaccgtcca ggatggtagt   120
ctccgcgccg accgccagat agggcagcag gaacacgtgc atctgggccg agtggttagag   180
cggcagggag tgcacgggcc ggtcggtcgc ggcgaggccg agcgcggtga tcgcgctgac   240
gtactcgtgg accagggccc cgtgcgtcat catcgcgcc ttgggcaggc cggtgggtccc   300
ggaggtgtac agcagctgca ccaggtcgtc ggaggcgggc gggcgccgcg ggttgaacgc   360
ccgttccgtc tccagggcgt cgagcagcga gccgggcgcg tcgcggagcg cgcgcaccgg   420
gagtcggcg gggagccgcc cggcgaggtc cgggtcggtc aggacgaggg aggagccgga   480
ctggtcgagg aggtaggcca ggtcgtcgcc ggtgaggttc tggttgaccg gtacgtggac   540
gagaccggcc cgtgcgcagg cgaggaagcc gatcagatag gcgtcggagt tgtgcgcgta   600
ggcggccacc cggtcgccgg gggcgagagc gtactcctcg gtgaggacgg cggcggccgt   660
ggagacggcg gcgtccaggg agcggtaggt ccaggtccgg tcggcgtagc gcacggcggt   720
ccggtcgggg gtgcgccggg cgctgcgggt gaggacgccg tcgactgtgc tgctgcgtac   780
acctgtcatg gcgtgatcct gtgcgtccgg gccctcgggg gtcaagaggc tggataccga   840
ccagacggtt gacagcttcc cgggctccct ggctgagtga cgcttggccg tccgggcgtt   900
    
```

ccggaccggc	cgcgcccgtg	ccacccgtac	cgctgggagg	aaacacc	ttg	acg	tta	956								
							Leu Thr Leu									
cgc	aac	cgt	ctg	aga	ctg	ctc	ggg	gtc	gcc	ggt	ctc	gcc	ctg	ttc	acc	1004
Arg	Asn	Arg	Leu	Arg	Leu	Leu	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Phe	Thr	
-35					-30						-25					
gtg	tcg	gcg	tcg	ctg	ccg	cct	gcc	acc	gcg	tcc	ggg	acc	cag	gag	acg	1052
Val	Ser	Ala	Ser	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr	Ala	Ser	Gly	Thr	Gln	Glu	Thr	
-20					-15						-10				-5	
cgg	cac	ccg	tcc	ggg	agc	ggt	ctt	tcg	gcc	gtc	atc	cgg	tac	acg	gag	1100
Arg	His	Pro	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Ser	Ala	Val	Ile	Arg	Tyr	Thr	Glu	
					1					5					10	
tac	ggc	att	ccg	cac	atc	gtg	gcg	gag	gac	tac	gcg	cag	ttg	ggc	ttc	1148
Tyr	Gly	Ile	Pro	His	Ile	Val	Ala	Glu	Asp	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	Phe	
					15					20					25	
ggc	acc	ggc	tgg	gcg	cag	gcc	gcc	gat	cag	gtg	tgc	acg	ctg	gcg	gac	1196
Gly	Thr	Gly	Trp	Ala	Gln	Ala	Ala	Asp	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Ala	Asp	
					30					35					40	
ggc	ttc	ctc	acg	gtg	cgc	ggg	gag	cgg	tcg	agg	ttc	ttc	ggc	ccg	gac	1244
Gly	Phe	Leu	Thr	Val	Arg	Gly	Glu	Arg	Ser	Arg	Phe	Phe	Gly	Pro	Asp	
					45					50					55	
gcc	gcc	acg	gac	tac	tcc	ctc	tcc	tcg	gcg	gcg	acg	aac	ctc	tcc	agc	1292
Ala	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Ala	Ala	Thr	Asn	Leu	Ser	Ser	
					65					70					75	
gac	ctg	tac	ttc	cgg	ggc	gtc	cgc	gac	agc	ggc	acg	gtg	gag	aag	ctg	1340
Asp	Leu	Tyr	Phe	Arg	Gly	Val	Arg	Asp	Ser	Gly	Thr	Val	Glu	Lys	Leu	
					80					85					90	
ctc	aag	gag	ccc	gcg	ccc	gcc	ggt	ccg	agc	agg	gac	gtc	aag	gag	acg	1388
Leu	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Ala	Gly	Pro	Ser	Arg	Asp	Val	Lys	Glu	Thr	

95	100	105	
atg cgc ggg ttc gcc gcc ggg tac aac gcg tgg atc gcg cag aac cgg			1436
Met Arg Gly Phe Ala Ala Gly Tyr Asn Ala Trp Ile Ala Gln Asn Arg			
110	115	120	
atc acc gac ccc gcc tgc cgg ggc gcg tcc tgg gtg cgc ccg gtg acg			1484
Ile Thr Asp Pro Ala Cys Arg Gly Ala Ser Trp Val Arg Pro Val Thr			
125	130	135	140
gcg ctg gac gtg gcg gcg cgc ggc tac gcg ctg gcg gtg ctc ggc ggc			1532
Ala Leu Asp Val Ala Ala Arg Gly Tyr Ala Leu Ala Val Leu Gly Gly			
145	150	155	
cag ggg cgc ggc atc gac ggc atc acc gcg gca cag ccg ccg acc gcc			1580
Gln Gly Arg Gly Ile Asp Gly Ile Thr Ala Ala Gln Pro Pro Thr Ala			
160	165	170	
gct cct ccg gcg gcc ggg gtc acg ccc gag gag gcg gcg acg gcg gcg			1628
Ala Pro Pro Ala Ala Gly Val Thr Pro Glu Glu Ala Ala Thr Ala Ala			
175	180	185	
gag cgg ctg ctg tcg acg cag aac gcg gac atg ggt tcc aac gcg gtg			1676
Glu Arg Leu Leu Ser Thr Gln Asn Ala Asp Met Gly Ser Asn Ala Val			
190	195	200	
gcc ttc gac ggc tcc acg acg gtg aac ggg cgc ggg ctg ttg ctc ggc			1724
Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly Leu Leu Leu Gly			
205	210	215	220
aac ccg cac tac ccg tgg cag ggc gga cgc cgc ttc tgg cag gcg cag			1772
Asn Pro His Tyr Pro Trp Gln Gly Gly Arg Arg Phe Trp Gln Ala Gln			
225	230	235	
cag acg atc ccc ggc gag ctg aac gtg tcg ggc gcg tcc ctg ctg ggc			1820
Gln Thr Ile Pro Gly Glu Leu Asn Val Ser Gly Ala Ser Leu Leu Gly			
240	245	250	
gcg acg acg atc tcg atc ggg cac aac gcc gat gtg gcg tgg agc cat			1868

Ala Thr Thr Ile Ser Ile Gly His Asn Ala Asp Val Ala Trp Ser His	
255	260
acg gtc gcc acg ggc gtc acg ctg aat ctg cat cag ctc agc ctc gat	1916
Thr Val Ala Thr Gly Val Thr Leu Asn Leu His Gln Leu Ser Leu Asp	
270	275
ccg gcc gac ccg acc gtc tat ctg gtg gac ggg aag cgg gag cgg atg	1964
<hr/>	
Pro Ala Asp Pro Thr Val Tyr Leu Val Asp Gly Lys Arg Glu Arg Met	
285	290
acg cag cgg acg gtg agc gtc ccg gtg aag ggc ggg gcc gac gtg acc	2012
Thr Gln Arg Thr Val Ser Val Pro Val Lys Gly Gly Ala Asp Val Thr	
305	310
cgc acc cag tgg tgg acc cgc tac ggg ccg gtg gcc acc tcg atg ggc	2060
Arg Thr Gln Trp Trp Thr Arg Tyr Gly Pro Val Ala Thr Ser Met Gly	
320	325
gcg ggg ctg ccg ttg ccg tgg acg gcg agc acg gcg tac gcg ctg aac	2108
Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Leu Asn	
335	340
gat ccg aac gcg acg aat ctg cgg atg gcg gac acc ggt ctg ggc ttc	2156
Asp Pro Asn Ala Thr Asn Leu Arg Met Ala Asp Thr Gly Leu Gly Phe	
350	355
ggc aag gcc cgc tcc acg ggt gac gtc gag cgt gcg ctg cac cgg tcg	2204
Gly Lys Ala Arg Ser Thr Gly Asp Val Glu Arg Ala Leu His Arg Ser	
365	370
cag ggc atg ccg tgg gtg aac acg atc gcg gcg gac cgg gcg ggt cgc	2252
Gln Gly Met Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Ala Asp Arg Ala Gly Arg	
385	390
tcg ttc ttc gcg cag tcg cag gtg ctg ccg agg atc acc gac gcg ttg	2300
Ser Phe Phe Ala Gln Ser Gln Val Leu Pro Arg Ile Thr Asp Ala Leu	
400	405
	410

gcg gag cgc tgc tgc acc ccg ctg ggc cgg gcc acc tac ccc gct tcc 2348
Ala Glu Arg Cys Ser Thr Pro Leu Gly Arg Ala Thr Tyr Pro Ala Ser

415

420

425

ggc ctc gcg gtg ctg gac ggt tgc cgg acg gac tgc gcg ctg ggc agc 2396
Gly Leu Ala Val Leu Asp Gly Ser Arg Thr Asp Cys Ala Leu Gly Ser

430

435

440

gac ccg gac gcg gtg cgg ccg ggg atc ttc ggc ccg ggc cgg atg ccg 2444
Asp Pro Asp Ala Val Arg Pro Gly Ile Phe Gly Pro Gly Arg Met Pro

445

450

455

460

gtg ctg aag aac cag ccg tac gtg gag aac tcc aac gac agc gcg tgg 2492
Val Leu Lys Asn Gln Pro Tyr Val Glu Asn Ser Asn Asp Ser Ala Trp

465

470

475

ctg acc aat gcg gag cgg ccg ctg acc ggg tac gag cgg gtc ttc ggc 2540
Leu Thr Asn Ala Glu Arg Pro Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Val Phe Gly

480

485

490

acg atc gcg acg ccc cgg tgc atg cgg acg cgc ggc gcg atc gag gac 2588
Thr Ile Ala Thr Pro Arg Ser Met Arg Thr Arg Gly Ala Ile Glu Asp

495

500

505

gtc gcg tgc atg gcg gac cgg ggc cgc ctc cgg gtc ggg gac ctt cag 2636
Val Ala Ser Met Ala Asp Arg Gly Arg Leu Arg Val Gly Asp Leu Gln

510

515

520

cgg cag cag ttc gcc aac cgt gcg ccg gcc ggg gat ctg gcc gcc tcc 2684
Arg Gln Gln Phe Ala Asn Arg Ala Pro Ala Gly Asp Leu Ala Ala Ser

525

530

535

540

gag gcc gcc aag tgg tgt gcg gcg ctg ccg ggc ggc acg gcc gtg ggc 2732
Glu Ala Ala Lys Trp Cys Ala Ala Leu Pro Gly Gly Thr Ala Val Gly

545

550

555

tcc gac gga acg ccg gtc gac gtg tgc gcg gcc tgc cgg gtg ctg cgg 2780
Ser Asp Gly Thr Pro Val Asp Val Ser Ala Ala Cys Arg Val Leu Arg

560	565	570	
cgc tgg gac cgg acc gtg gac agc gac agc cgg ggc gcg ctg ctc ttc			2828
Arg Trp Asp Arg Thr Val Asp Ser Asp Ser Arg Gly Ala Leu Leu Phe			
575	580	585	
gac cgg ttc tgg cgg aag gcg tcg tcg gcg ccc gcc gcc gag ctg tgg			2876
Asp Arg Phe Trp Arg Lys Ala Ser Ser Ala Pro Ala Ala Glu Leu Trp			
590	595	600	
agg acg ccg ttc gat ccg gcc gac ccg gtg cgc act ccg cgc ggc ctg			2924
Arg Thr Pro Phe Asp Pro Ala Asp Pro Val Arg Thr Pro Arg Gly Leu			
605	610	615	620
aac acg gcc gcg ccc gtc ctg ggc agg gcc ctg gcg gac gcc gtg gcg			2962
Asn Thr Ala Ala Pro Val Leu Gly Arg Ala Leu Ala Asp Ala Val Ala			
625	630	635	
gag ctg cgg gcg gcg ggc atc gcg ctg gac gcc ccg ctg ggc gag cac			3020
Glu Leu Arg Ala Ala Gly Ile Ala Leu Asp Ala Pro Leu Gly Glu His			
640	645	650	
cag ttc gtc gtg cgg aac ggc aag cgg ctc ccg atc ggc ggc ggg acg			3068
Gln Phe Val Val Arg Asn Gly Lys Arg Leu Pro Ile Gly Gly Gly Thr			
655	660	665	
gag tcg ctg ggc atc tgg aac aag acc gag ccg cag tgg aac gcg gcg			3116
Glu Ser Leu Gly Ile Trp Asn Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asn Ala Ala			
670	675	680	
ggc ggc ggc tat acg gag gtg tcg tcg ggc tcc agc tac atc cag gcg			3164
Gly Gly Gly Tyr Thr Glu Val Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Ile Gln Ala			
685	690	695	700
gtc ggc tgg gac gac agc cgc tgc ccg gtg gcc cgg acg ctg ctg acg			3212
Val Gly Trp Asp Asp Ser Arg Cys Pro Val Ala Arg Thr Leu Leu Thr			
705	710	715	
tac tcc cag tcg gag aac ccg aag tca ccg cac tac agc gac cag acc			3260

Tyr Ser Gln Ser Glu Asn Pro Lys Ser Pro His Tyr Ser Asp Gln Thr	
720 725 730	
agg ctg tac gcg ggt gag cgc tgg gtg acg tcc cgg ttc tgc gag agg	3308
Arg Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Trp Val Thr Ser Arg Phe Cys Glu Arg	
735 740 745	
gac atc gcg cgt tcc ccg gac ctg cgg gtg gtg cgg gtg cac gag cgg	3356
<hr/>	
Asp Ile Ala Arg Ser Pro Asp Leu Arg Val Val Arg Val His Glu Arg	
750 755 760	
cgg tag cgcggtg ggcggacggg cccgcccac cgcggcgaga agggcgtccg	3409
Arg	
765	
cctcggcggg cgcccttctc accgatgtgt cgtgaccgcg ctcccggggg cgtcctcacc	3469
gagccgccga agggcccggc ggccgaaccc gtgaccatgc gtgcgacgca tcacgctccg	3529
tcggctccgc cctccgcccg cgcccaggcc agctgcgcgt cgctcagcgg cgggtcgaag	3589
ccttccggga acagcagcat ccgcggctgc ggccacatgt tctccggtcc gtgttctga	3649
cagtccaggg cgaggagatg cggcccgtcc ccgcaggact cgtgccggtg ggggcggtcg	3709
tgccccggc agaaatagcc gaacaccgca cagtggctgt cgccgcccgg tcggtggaag	3769
ccggggtcgc tgacgatcac ggtcaccggc tcctgccggt tgagccgagg gatgggccgg	3829
ggatcacgcc acaacagtcg aggaggagc acacgctcat cttcccggg gccgagccca	3889
cgggaagggg gagcacggcg ggacgcctcc cgtcggcgtg atcgaccggg ccgtcccgt	3949
cgcgggcggg cctccccgga cccgttgctc tacagcgggc gtcgaagcc ctcccagtac	4009
ggttcgcgca gccgccgttt gtagagcttg ccgttggggg cgcggggcat ggcggtgatg	4069
aagtcgaggc tccggggtcg tttgtagccg gcgagccgct cctcgcagtg ggcgaggatc	4129
gcggcggcga gcgcgggtga cggctcgttg ccatcggccg gttcgacgac ggccttgacc	4189
tcctcgccgc ggtcggcgtg ggggatgccg aaggcggcgg cgtccgcgac ggcggggtgg	4249
gtgagcagga ccgactcgat ctccggcggg tagatgttga ccccgcccgc gatgatcatg	4309
tcgatcttgc ggtcgcggag gaagaggtag ccgtcctcgt ccagcacgcc gaggtcaccg	4369
acggtgaaga agtcgccgat gcggttcgtg cgggtcttgg tctcgtcctt gtggtagctg	4429
aagccgccgg tgctcatctt catgtagacg gtgcccagtt cgcctggcgg gaggcggtg	4489

ccgtcgtcgt cgaagacggc cagttcgtc atcgccagg ccttgccgac ggtgccgggc 4549
 ttcttcagcc agtcctcggc ggtggcgaac gctccccgc cctcgctggc cgcgtagtag 4609
 tcctcgacgc agctccccca ccagtcgac atggcgcgtt tgacgtggc ggggcagggg 4669
 gctgccccgt ggatggcgtg ccgcatggag gagacgtcgt agcgggacct cacctcgtcg 4729
 ggagcgcgga gcagccgggtg gaactgggtg gggaccatgt ggggtgtgggt gcagcggttg 4789
 gcgtcgacga ggcgagcat ctctcgggc gaccagccgt ccatcaggac cagcggttg 4849

ccgatgtgca gggcgccgcc cgcgaattgg agtacggcgg tgtggtagag cggcgagcag 4909
 accaggtgga cgttgtcgtc gaacggccgg atgccgaaga tgccgaggaa cccgccgagg 4969
 taggtctcct cggggcggtt gccgggcagg gggcgccgga tgccgcgggg gcggccggtg 5029
 gtgcccaggg tgtagttcat gaccagccg aggggtgcgtt tctcaggcgg cgtggcgggg 5089
 tggccttcga ggagttcggc ccaggggcgg cagccgggga ccgtgccgac gccgtagcgg 5149
 tgggtcgcgg gcagttccgc ctctcggcg gcggccgtcg cggtgccgc gaagcgttcg 5209
 tgggcgatca ggacgcgggc gccggagtcg gcgacgatcc aggcgatctc ggggccgacg 5269
 aggtgggtgt tgaccggcac gaggtagaag ccggcctcgc aggcggcgag gtgggcgggtg 5329
 aggagttcga cgcgttggg caggacgacg gcgaacgcgt cgcctcgc cagtccggcc 5389
 gcgcgcaggc cgtggacat gcggttgacg tcggcgtgca ggcggccgc gctccactcc 5449
 tcgccgtcgg gggcgatcag gacggtgcgg tcggggtcgg ctgcggcctg ggcccagaaa 5509
 ccgttgggcg gctggttcac gtggcactcc ttccggcgat gcggttcatt cgggtgacgg 5569
 cccgttcgaa gccgcgggtc aggtcgtcga cgacggccc gacgtcgt tacttggtca 5629
 tccggccgac gatctgccc acgggcgtgc cgagcagctc gccgacctg tacttctgga 5689
 tcc 5692

<210> 2

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Streptomyces Sp.

<400> 2

Ser Asn Ala Val Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly

1 5 10 15
 Leu Leu Leu Gly
 20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Streptomyces Sp.

<400> 3

Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro

1 5 10 15

His His Val Ala

20

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (forward) to amplify the DNA coding N-terminal amino acid sequences of FR901379 acyrase small subunit.

<400> 4

ctstcsgcsg tsatc

15

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (reverse) to amplify the DNA coding N-terminal amino acid sequences of FR901379 acyrase small subunit.

<400> 5

gtggtgsggg atsc

15

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (forward) to amplify the DNA coding N-terminal amino acid sequences of FR901379 acyrase large subunit.

<400> 6

csgtsgcstt cgacgg

16

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (reverse) to amplify the DNA coding N-terminal amino acid sequences of FR901379 acyrase large subunit.

<400> 7

sccsagsags agscc

15

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (forward) to am

plify the DNA coding sequence between FR901379 acyrase small subunit and large subunit.

<400> 8
 atccggtaca cggagtacgg 20

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (reverse) to am
 plify the DNA coding sequence between FR901379 acyrase small subunit and large subunit.

<400> 9
 cgttcaccgtc gtggagcc 20

<210> 10
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed for use in changing site from EcoR I site to Sac I site.

<400> 10

aattgagctc

10

<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 11

caactgcgcg tagtcc

16

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 12

catgggttcc aacgcg

16

<210> 13

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 13

gctgtcaacc gtctgg

16

<210> 14
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 14

acgcgctgaa cgatcc 16

<210> 15
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 15

cggacctgga cctacc 16

<210> 16
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 16

gtgggtgaac acgatcg 17

<210> 17

<211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 17

gaccttcagc ggcagc

16

<210> 18
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 18

caagtgggtg gcggcg

16

<210> 19
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 19

gtcgctgggc atctgg

16

<210> 20
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 20

gctgctgacg tactcc

16

<210> 21

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 21

gtcaaccgca tggctc

16

<210> 22

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 22

atcgccctgga tcgtcg

16

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 23

cgtcagcgcg atcacc

16

<210> 24

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 24

ggtgtacagc agctgc

16

<210> 25

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 25

ctccctcgtc ctgacc

16

<210> 26

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 26

gagttgtgcg cgtagg

16

<210> 27

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 27

tgacgcttgg ccgtcc

16

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 28

gactacgcgc agttgg

16

<210> 29

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 29

tacaacgcgt ggatcg

16

<210> 30
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 30
 ggtgatccgg ttctgc 16

<210> 31
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 31
 gggtagtgcg ggttgc 16

<210> 32
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 32
 ctgcatcagc tcagcc 16

<210> 33
 <211> 16

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 33
 gtccaccact gggtagc

16

<210> 34
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 34
 gaagcggggg aggtgg

16

<210> 35
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 35
 ccggtgctga agaacc

16

<210> 36
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 36

ctgccgctga aggtcc

16

<210> 37

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 37

tcgaacggcg tcctcc

16

<210> 38

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 38

tggaggacgc cgttcg

16

<210> 39

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 39

gcctggatgt agctgg

16

<210> 40

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 40

ggacatcgcg cgttcg

16

<210> 41

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 41

cgaacgcgcg atgtcc

16

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 42

ccgtgaccat gcgtgc

16

<210> 43
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 43

gcacgcatgg tcacgg 16

<210> 44
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 44

gaggagacct acctcg 16

<210> 45
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 45

aggtcccgt acgacg 16

<210> 46

<211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 46

gaccatgcgg ttgacg

16

<210> 47
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 47

cagttccgcc tcgtcg

16

<210> 48
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.
 <400> 48

caggtggacg ttgtcg

16

<210> 49
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 49

gtcgctgacg atcacg

16

<210> 50

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 50

gtgatcgatca gcgacc

16

<210> 51

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 51

ggcggatgatg aagtcg

16

<210> 52

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 52

cgacttcac accgcc

16

<210> 53

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 53

ggcgacttct tcaccg

16

<210> 54

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 54

cggatgaaga gtcgcc

16

<210> 55

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 55

ccagacggtt gacagc

16

【図面の簡単な説明】

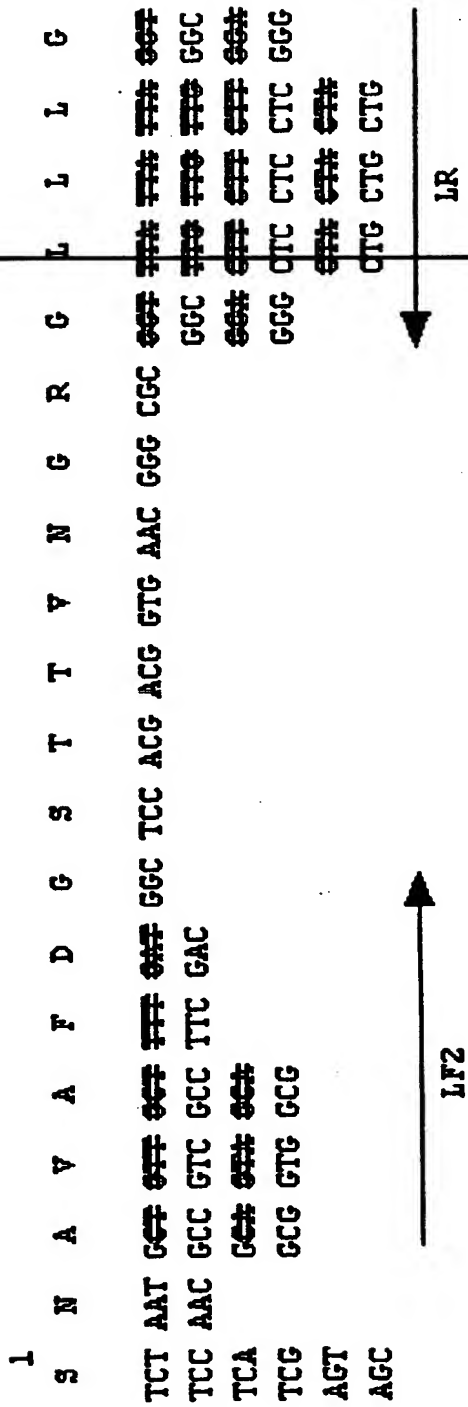
【図 1】

環状リポペプチドアシラーゼ小サブユニットの一部のN末端アミノ酸配列を決定した結果を示す図である。

【図 2】

環状リポペプチドアシラーゼ大サブユニットの一部のN末端アミノ酸配列を決定した結果を示す図である。

【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 環状リポペプチドアシラーゼのコード領域の塩基配列の決定、および当該アシラーゼの全アミノ酸配列の決定。当該酵素をコードする遺伝子を含む発現ベクター、および当該発現ベクターを宿主細胞内で発現させることによる環状リポペプチドアシラーゼの製造方法の提供。

【効果】 従来の環状リポペプチドアシラーゼ生産菌を培養して得られるアシラーゼと同等の活性を有し、且つ遺伝子工学的に作製した形質転換体を使用することにより、その培養にかかる時間（すなわちアシラーゼ生産にかかる時間）を短縮することが可能となった。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005245]

1. 変更年月日 ~~1990年 8月17日~~

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号

氏 名 藤沢薬品工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)